

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Bahan

4.1.1. Bahan untuk Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah kolostrum sapi (dihasilkan dari induk sapi setelah 4-5 hari melahirkan anak sapi) diperoleh dari Peternakan Sapi Perah “Rukmini” di Jl. Bendul Merisi Gg. Besar Selatan no 39, Surabaya; susu UHT *full cream* “Ultramilk”; susu skim “Sunlac” diperoleh dari supermarket “Hokky” Surabaya; kultur murni *Streptococcus thermophilus* FNCC 0040 dan *Lactobacillus bulgaricus* FNCC 0041; gula pasir “Gulaku” diperoleh dari supermarket “Bilka” Surabaya; akuades dari “PT. Megah Sejahtera Scientif”. Bahan lain seperti media MRS *Broth* dan media agar kultur ST dan LB serta semua media diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Industri Pangan FTP-UKWMS. Spesifikasi bahan penelitian terdapat pada Lampiran A.

4.1.2. Bahan untuk Analisa

Bahan yang digunakan untuk analisa adalah kristal NaOH p.a. (Mallinckrodt fw 0.40.00), kristal $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ p.a. (Merck 1.0495), indikator *phenolphthalein* (Riedel de Haen 33.518), alkohol 96% dan spiritus.

4.2. Alat

4.2.1. Alat untuk Penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian adalah inkubator “WTC Binder”, autoklaf, oven “WTC Binder”, timbangan *digital* analitis “Sartorius Gold” PG 5001-S, *refrigerator* “Sharp”, cup plastik “Lionstar” 145mL, gelas ukur 100 mL, pipet ukur 1 mL; 10 mL; 25 mL, erlenmeyer 250 mL, thermometer 100°C, tabung reaksi, rak tabung reaksi, bunsen,

waterbath “LabTech”, kawat ose berkelong, sumbat kapas, kertas coklat, plastik PP dan korek api.

4.2.2. Alat untuk Analisa

Alat-alat yang digunakan untuk analisa adalah pH meter “Trans Instrument” TI-2100, botol timbang, labu takar 100 mL; 1L, erlenmeyer 250 mL “Schoot Duran”, beker gelas 100 mL; 500 mL, pipet volume 10 mL “Pyrex”, pipet tetes, buret “Assistant”, statif, corong, sendok tanduk, batang pengaduk dan botol semprot.

4.3. Waktu dan Tempat Penelitian

4.3.1. Waktu Penelitian

Penelitian pendahuluan dilaksanakan pada bulan Juli 2013 sampai bulan September 2013. Penelitian utama dilaksanakan pada bulan Oktober 2013 sampai Desember 2013.

4.3.2. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Industri Pangan, dan Laboratorium Kimia-Biokimia Pangan dan Gizi Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

4.4. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Faktor Tunggal dengan dasar Rancangan Acak Kelompok (RAK) yaitu penambahan variasi konsentrasi susu skim pada pembuatan yoghurt kolostrum sapi sehingga diperoleh 6 perlakuan. Masing-masing perlakuan akan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali sehingga akan diperoleh total 24 unit eksperimen. Rancangan penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.1. Faktor perlakuan dalam penelitian ini adalah :

S_1 : Penambahan susu skim = 0% (b/v).

S_2 : Penambahan susu skim = 1% (b/v).

S_3 : Penambahan susu skim = 2% (b/v).

S_4 : Penambahan susu skim = 3% (b/v).

S_5 : Penambahan susu skim = 4% (b/v).

S_6 : Penambahan susu skim = 5% (b/v).

Tabel 4.1. Rancangan Penelitian

Proporsi susu skim dan susu sapi segar (S)					
S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6
$S_1(1)$	$S_2(1)$	$S_3(1)$	$S_4(1)$	$S_5(1)$	$S_6(1)$
$S_1(2)$	$S_2(2)$	$S_3(2)$	$S_4(2)$	$S_5(2)$	$S_6(2)$
$S_1(3)$	$S_2(3)$	$S_3(3)$	$S_4(3)$	$S_5(3)$	$S_6(3)$
$S_1(4)$	$S_2(4)$	$S_3(4)$	$S_4(4)$	$S_5(4)$	$S_6(4)$

Parameter yang akan diuji adalah pH, total asam laktat yoghurt kolostrum serta sineresis yoghurt. Data yang diperoleh dari masing-masing pengujian akan dianalisa dengan statistik menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Varians*) pada $\alpha=5\%$ untuk mengetahui apakah perlakuan memberikan pengaruh nyata pada setiap parameter pengujian. Apabila hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan uji perbedaan untuk menentukan taraf perlakuan mana yang memberikan perbedaan nyata. Uji perbedaan dilakukan dengan Uji beda jarak nyata Duncan (*Duncan's Multiple Range Test/ DMRT*) pada $\alpha = 5\%$

4.5. Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan melalui dua tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian lanjutan. Penelitian pendahuluan bertujuan untuk menentukan kisaran susu skim yang digunakan terhadap kolostrum sapi pada pembuatan yoghurt kolostrum. Penelitian lanjutan menerapkan hasil penelitian sesuai dengan faktor yang ditentukan dan menganalisa perlakuan yang dilaksanakan dalam percobaan.

4.5.1. Pembuatan Yoghurt Kolostrum

Proses pembuatan yoghurt kolostrum berdasarkan formulasi unit terdapat pada Tabel 4.2 dengan diagram alir penelitian pembuatan yoghurt dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Tahapan pembuatan yoghurt kolostrum adalah :

a. Pasteurisasi

Pasteurisasi dilakukan pada suhu 77°C selama 15 menit. Pasteurisasi menggunakan *shaking waterbath* “LabTech” dengan pengaturan suhu 87 °C, waktu selama 1 jam dan kecepatan 100 rpm.

Pasteurisasi dilakukan untuk membunuh semua bakteri patogen pada susu sapi segar yang akan digunakan sehingga tidak mempengaruhi pertumbuhan BAL.

Pasteurisasi juga bertujuan untuk mengurangi kandungan air dan oksigen pada susu selain itu pemanasan juga menyebabkan denaturasi protein whey sehingga dapat diperoleh konsistensi yang baik dan seragam pada produk akhir (Buckle dkk., 2009).

b. Pendinginan

Pendinginan dilakukan hingga mencapai 40-45°C untuk mengondisikan suhu pertumbuhan yang optimum bagi BAL (Hui, 1992).

c. Inokulasi

Inokulasi adalah pemberian *starter* LB dan ST pada susu yang telah bersuhu 40-45°C. Penambahan masing-masing untuk LB dan ST adalah 6,25% (%v) dengan perbandingan ST dan LB = 1 : 1.

d. Pengemasan

Pengemasan yoghurt dilakukan pada kemasan cup *polypropylene* kapasitas 145 mL yang sebelumnya telah disemprot dengan alkohol dan disterilkan dengan sinar UV selama satu jam. Cup diisi dengan 50 mL yoghurt kolostrum

Cup yang sudah dilakukan pengisian akan diberi label sesuai dengan perlakuan. Pelabelan dilakukan untuk membedakan antara satu perlakuan dengan yang lain.

Tabel 4.2. Formulasi Pembuatan Yoghurt Kolostrum Sapi

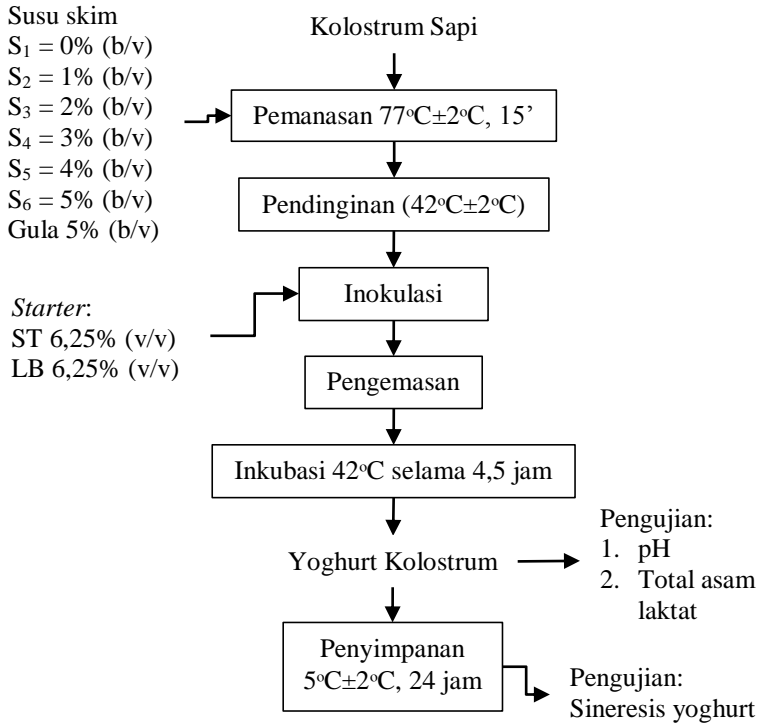
Bahan-bahan	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
Kolostrum sapi (mL)	400	400	400	400	400	400
Susu skim (^b / _v) (g)	0	4	8	12	16	20
Gula 5% (^b / _v)* (g)	20	20	20	20	20	20
Starter ST 6,25% (^v / _v)* (mL)	25	25	25	25	25	25
Starter LB 6,25% (^v / _v)* (mL)	25	25	25	25	25	25
Total unit percobaan	470	474	478	482	486	490

Keterangan:

* = dihitung dari kolostrum sebelum dipanaskan (400mL).

Contoh perhitungan (untuk S₁) :

- Kolostrum sapi → 400 mL.
- Susu skim 0% (^b/_v) → $0/100 \times 400 \text{ mL} = 0 \text{ g}$.
- Gula pasir 5% (^b/_v) → $5/100 \times 400 \text{ mL} = 25 \text{ g}$.
- Starter LB 6,2 5% (^v/_v) → $6,25/100 \times 400 \text{ mL} = 25 \text{ mL}$.
- Starter ST 6,25% (^v/_v) → $6,25/100 \times 400 \text{ mL} = 25 \text{ mL}$



Gambar 4.1. Diagram Alir Penelitian Pembuatan Yoghurt Kolostrum Sapi
Sumber: Tamime dan Robinson, 2007 (dengan modifikasi)

e. Inkubasi

Inkubasi dilakukan selama kurang lebih 4,5 jam untuk memberi kesempatan bagi LB dan ST dalam memfermentasi laktosa dan menghasilkan asam laktat. Inkubasi dilakukan di dalam inkubator pada suhu 42°C yang merupakan suhu pertumbuhan optimum BAL.

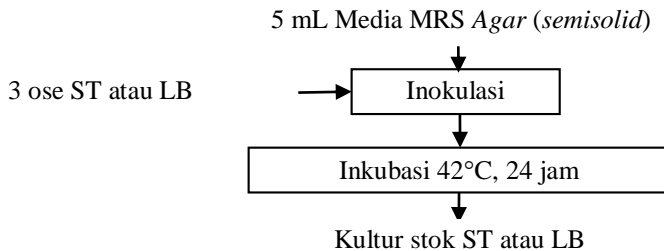
g. Penyimpanan

Yoghurt yang sudah selesai diinkubasi akan disimpan di dalam refrigerator dengan suhu 4-5°C selama 24 jam. Penyimpanan dilakukan untuk menghentikan atau memperlambat proses fermentasi yoghurt agar tidak terjadi *over-fermented*.

4.5.2. Pembuatan Starter Yoghurt

4.5.2.1. Peremajaan Kultur Stok

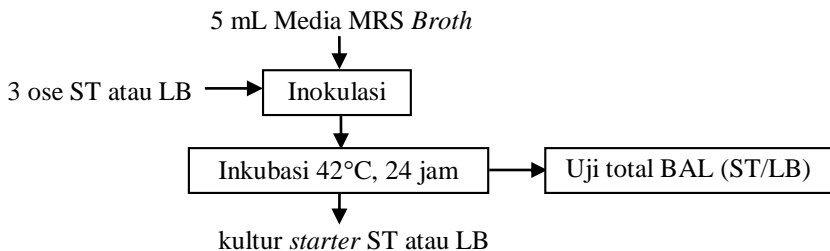
Kultur stok yang digunakan dalam pembuatan yoghurt adalah kultur stok LB dan ST. Tahapan peremajaan kultur stok dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Diagram Alir Peremajaan Kultur Stok BAL
Sumber: Fardiaz, 1989

4.5.2.2. Pembuatan Kultur Starter

Tahapan pembuatan kultur *starter* dapat dilihat pada Gambar 4.3. Penghitungan jumlah bakteri pada kultur *starter* terdapat pada Lampiran C.



Gambar 4.3. Diagram Alir Pembuatan Kultur *Starter* BAL
Sumber: Fardiaz, 1989

Penjelasan proses:

a. Inokulasi Starter

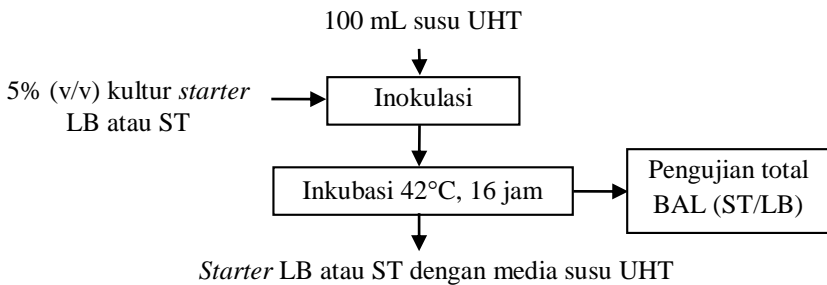
Tahapan ini bertujuan untuk menginokulasikan starter ST dan LB ke dalam masing-masing media de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) *broth* dengan menggunakan ose berkolong sebanyak 3 ose. Proses inokulasi dilakukan secara aseptis yaitu dengan dilakukan di dekat nyala api.

b. Inkubasi

Tujuan dari tahapan ini adalah untuk memberi kesempatan bagi ST dan LB untuk tumbuh dengan memanfaatkan nutrisi yang ada pada media MRS *broth*. Proses ini dilakukan pada suhu 42°C karena suhu ini merupakan suhu optimal bagi pertumbuhan BAL (Hui, 1992).

4.5.2.3. Pembuatan *Starter* ST dan LB pada Susu UHT

Tahapan pembuatan *starter* ST dan LB pada susu UHT dapat dilihat pada Gambar 4.4. Penghitungan jumlah bakteri pada *starter* terdapat pada Lampiran C.



Gambar 4.4. Diagram Alir Pembuatan *Starter* LB dan ST pada Susu UHT

Sumber: Djaafar dan Rahayu, 2006

Penjelasan proses:

a. Inokulasi Starter

Tahapan ini bertujuan untuk menginokulasikan kultur murni LB ke dalam susu UHT sebanyak 5% dari volume larutan susu UHT yang digunakan. Proses inokulasi dilakukan secara aseptis yaitu dengan dilakukan di dekat nyala api.

b. Inkubasi

Tujuan dari tahapan ini adalah untuk memberi kesempatan bagi LB untuk memfermentasi laktosa dan menghasilkan asam laktat dan metabolit lain. Proses ini dilakukan pada suhu 42°C karena suhu ini merupakan suhu optimal bagi pertumbuhan BAL (Hui, 1992).

4.6. Metode Analisa

Yoghurt kolostrum yang dihasilkan dilakukan pengujian fisikokimia (total asam dan pH) dan sineresis. Sineresis dilakukan setelah yoghurt kolostrum disimpan dalam refrigerator (5-7°C) selama 24 jam. Prosedur pengujian sebagai berikut:

4.6.1. Pengujian Total Asam Laktat (AOAC.947.05 dengan modifikasi)

Tahapan pengukuran total asam laktat adalah sebagai berikut:

1. Sebanyak 10 mL yoghurt kolostrum dipipet secara analitis, kemudian ditambah akuades hingga 100 mL.
2. Ambil 10 mL campuran secara analitis, ditambah 100 mL akuades dan 3 tetes indikator *phenolphthalein* 1%.
3. Titrasi dengan menggunakan NaOH 0,1 N sampai larutan berwarna merah muda.
4. Total asam dinyatakan dengan total asam laktat (BM= 90) dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\% \text{Total Asam Laktat} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times \text{BM}_{\text{asam laktat}} \times \text{FP}}{m_{\text{sampel}} \times 1000} \times 100\%$$

4.6.2. Pengujian pH (Apriyantono dkk., 1989)

Tahapan pengukuran pH meter adalah sebagai berikut:

1. Sebelum digunakan pH meter dikalibrasi dengan mencelupkan elektroda pH meter ke dalam larutan buffer pH 7,0.
2. Elektroda pH meter dicuci dengan akuades menggunakan botol semprot. Sisa akuades yang masih menempel pada sisi-sisi elektroda dikeringkan dengan tissue.
3. Elektroda dicelupkan dalam sampel yoghurt dan dibiarkan beberapa saat untuk memperoleh pembacaan yang stabil.
4. Catat angka tersebut sebagai pH sampel.

4.6.3. Pengujian Sineresis (Amatayakul dkk., 2006)

Tahapan pengukuran sineresis adalah sebagai berikut:

1. Yoghurt yang telah diinkubasi pada suhu 42°C hingga mencapai pH 4,4-4,8; pengukuran sineresis dilakukan setelah yoghurt selesai di inkubasi dan setelah disimpan dalam refrigerator suhu 5°C selama 24 jam.
2. Yoghurt dalam cup ditimbang (berat awal), kemudian dimiringkan $\pm 45^\circ$ supaya cairan *whey* terkumpul.
3. Cairan *whey* yang terpisah dari padatan yoghurt disedot dengan menggunakan pipet tetes.
4. Yoghurt ditimbang kembali beserta cupnya (berat akhir).
5. Sineresis dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Sineresis} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\%$$

DAFTAR PUSTAKA

- Aak. 1995. *Petunjuk Praktis Beternak Sapi Perah*. Yogyakarta: Kanisius.
- Ahmadi, M., Velciov, A-B., Scurtu M., Ahmadi, T. dan Olariu, L. 2011. Benefits of Bovine Colostrum in Nutraceutical Products, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 17 (1): 42-45.
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan. Surat Keputusan KA. Badan POM RI No.: HK.00.05.52.4040. Tanggal: 9 Oktober 2006 Tentang Kategori Pangan. http://www2.pom.go.id/public/hukum_perundangan/pdf/COMBINE_03032011.pdf. (16 April 2013)
- Badan Standarisasi Nasional. *SNI 3141.1:2011: Susu Segar: Bagian 1-Sapi*. http://sisni.bsn.go.id/index.php/?sni_main/sni/detail_sni/11914. (16 April 2013).
- Badan Standarisasi Nasional. *SNI 2981:2009: Yogurt*. http://sisni.bsn.go.id/index.php/?sni_main/sni/detail_sni/10235. (4 April 2013).
- Blum, J. W. dan Hammon, H. 2000. Colostrum Effects on The Gastrointestinal Tract, and on Nutritional, Endocrine and Metabolic Parameters in Neonatal Calves, *Livestock Production Science*. 66: 151-159.
- Buckle, K.A., Edwards, R. A., Fleet, G. H. dan Wootton, M. 2009. *Ilmu Pangan*. Penerjemah: Hari Purnomo dan Adiono. Jakarta: UI Press.
- Chandan, R.C., White, C.H., Kilara, A., Hui, Y.H. 2006. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. USA : Blackwell Publishing.
- Conte, F. dan Scarantino, S. 2008. A Study on The Quality of Bovine Colostrum: Physical, Chemical and Safety Assessment, *Int. Food Research J*. 20 (2): 925-931.
- DeMan, J.M. 1997. *Kimia Makanan*. Bandung: Penerbit Institut Teknologi Bandung.
- Dwidjoseputro, D. 2010. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.

- Early, R., (Ed.). 1998. *The Technology of Dairy Products Second Edition*. UK: Blackie Academic & Professional.
- Effendi, H. M. S. 2009. *Teknologi Pengolahan dan Pengawetan Pangan*. Bandung: Alfabeta.
- Food Standards Australia New Zealand. *Milk, Cow, Fluid, Regular Fat (4%)*. <http://www.foodstandards.gov.au/consumerinformation/nuttab2010/nuttab2010onlinesearchabledatabase/onlineversion.cfm?&action=getFood&foodID=09A10163>. (11 April 2013).
- Food Standards Australia New Zealand. *Yogurt, Natural, Regular Fat (3,5%)*. <http://www.foodstandards.gov.au/consumerinformation/nuttab2010/nuttab2010onlinesearchabledatabase/onlineversion.cfm?&action=getFood&foodID=09C10088>. (8 April 2013).
- Georgiev, I. P. 2005. Alteration in Chemical Composition of Colostrum in Relationship to Post-Partum Time, *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 8(1): 35-39.
- Georgiev, I. P. 2008. Differences in Chemical Composition Between Cow Colostrum and Milk, *Bularian Journal of Veterinary Medicine*. 11(1): 3-12.
- Heinrichs, J. dan Jones, C. Composition and Hygiene of Colostrum on Modern Pennsylvania Dairy Farms, Departemen of Dairy and Animal Science, The Pennsylvania State University.
- Hui, Y. H., (Ed.) 1991. *Encyclopedia of Food Science and Technology Vol. 4*. USA: A Wiley-Interscience Publications.
- Hurley, W. L. *The Neonate and Colostrums*. <http://nutriweb.org.my/publications/mjn10nl.art1.pdf>. (13 Oktober 2013)
- Ide, P. 2008. *Health Secret of Kefir: Mengungkap Keajaiban Susu Asam untuk Penyembuhan Berbagai Penyakit*. Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Institute of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University. Microbime. <http://jpkc.njau.edu.cn/spwswx/cankao/ShouArticle.asp?ArticleID=314>. (23 September 2013).

- Jacobson, N. L. 1969. Energy and Protein Requirements of The Calf, *J. Dairy Sci.* 52: 1316-1321.
- Kelly, G. S. 2003. Bovine Colostrum: A Review of Clinical Uses, *Alternative Medicine Review.* 8(4): 378-394.
- Kertz, A. 2008. Composition of Bovine Colostrum Variable, *Feedstuffs.* 80(36): 1-2.
- Lee, W. J and Lucey, J. A. 2010. Formation and Physical Properties of Yogurt, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23 (9): 1127-1136.
- Lister, E. E. dan Lodge, G. A. 1973. Effect of Increasing The Energy Value of A Whole Milk Diet for Calves: I. Nutrient Digestibility and Nitrogen Retention, *Can. J. Anim. Sci.* 53: 307-316.
- Moeljanto, R. D. dan Wiryanta, B. T. W. 2002. *Khasiat dan Manfaat Susu Kambing: Susu Terbaik dari Hewan Ruminansia*. Tangerang: AgroMedia Pustaka.
- Ohiokpehai, O. 2003. Processed Food Products and Nutrient Composition of Goat Milk, *Pakistan. J. Nutr.* 2 (22): 68-71.
- Rice, D., Rogers, D. G. 1990. *Colostrum Quality and Absorption in Baby Calves, Feeding and Nutrition*. Institute of Agriculture and Natural Resources, Universitas Nebraska-Lincoln: Cooperative Extension.
- Rogosa, M. 1974. Lactobacillaceae/Bifidobacteriaceae. *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Batimore: The William and Wilkins Co.
- Saputra, F. 2008. Perbandingan Komposisi dan Daya Antimikroba antara Susu Sapi Segar (UHT), Kolostrum Sapi Segar dan Kolostrum Sapi Bubuk, *Skripsi S-1*, Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta.
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A. dan Wheeler, T. T. 2009. Immune Components of Bovine Colostrum and Milk, *J. Anim. Sci.* 87: 3-9.
- Stokes, B. C. dan Bourne, J. F. 1989. Mucosal Immunity-Immunoglobulin in Cow Colostrum, (dalam *Veterinary Clinical*

- Immunology*, Halliwell, R. E dan Gorman, N. T., Eds.), Philadelphia: WB Saunders Comp, 198-203
- Struff, W. G. dan Sprotte, G.. 2007. Bovine Colostrum as A Biologic in Clinical Medicine: A Review, *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 45 (4): 193-202.
- Struff, W. G. dan Sprotte, G.. 2008. Bovine Colostrum as A Biologic in Clinical Medicine: A Review-Part II, *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 46 (5): 211-225.
- Sumarmono, J. 2012. Teknologi Hasil Ternak: Susu Fermentasi dan Keju. <http://panganhewani.blog.unsoed.ac.id/files/2012/04/THT-Kuliah-5-dan-6.pdf>. (3 April 2013).
- Surajudin, Kusuma, F. R. dan Purnomo, D. 2008. *Yoghurt: Susu Fermentasi yang Menyehatkan*. Tangerang: AgroMedia Pustaka.
- Tamime, A.Y. and Robinson, R.K. 2007. *Yoghurt Science and Technology Third Edition*. England: Woodhead Publishing Limited.
- Trachoo, N. 2002. Yoghurt: The Fermented Milk, *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 24 (4): 727-737.
- Vincu, M. A., Ahmadi, T. dan Ahmadi, J. 2005. Colostrum As Nutritional Supplement In Sport, *Agroalimentary Processes and Technologies*. 11(1): 33-40.
- Winarno, F.G., Ahnan, W.W. dan Widjajanto, W. 2003. *Flora Usus dan Yogurt*. Bogor: M-Brio Press.
- Winarno, F. G. dan Fernandez, I. E. 2007. *Susu dan Produk Fermentasinya*. Bogor: M-Brio Press.